

HYBRID PLASMID

Patent Number: JP59088092
Publication date: 1984-05-21
Inventor(s): MIZUSHIMA SHIYOUJI
Applicant(s): SHOJI MIZUSHIMA
Requested Patent: ☐ JP59088092
Application Number: JP19820197360 19821110
Priority Number(s):
IPC Classification: C12N15/00; C07H21/04
EC Classification:
Equivalents:

Abstract

PURPOSE:A hybrid plasmid useful for manifestation of hybrid protein, obtained by inserting a specific DNA fragment into a scission cite of restriction enzyme Sal I of a plasmid having a large number of copies of Escherichia coli.

CONSTITUTION:A DNA fragment containing ompF gene and PVU II scission site in the downstream lower than the omF gene is obtained from lambdaomF1, ompF transduced lambda phase of Escherichia coli K-12 by cutting it with restriction enzyme Sal I and isolation. The DNA fragment is inserted into the scission site of restriction enzyme Sal I of a plasmid having a large number of copies of Escherichia coli. The hybrid plasmid, wherein the plasmid having a large number of copies is integrated with the DNA fragment containing the whole ompF gene, has the scission site of restriction enzyme BglII in the translation range of the downstream of signal peptide of ompF gene.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

⑫ 公開特許公報 (A)

昭59—88092

⑤ Int. Cl.³
C 12 N 15/00
C 07 H 21/04
// (C 12 N 15/00
C 12 R 1/19)

識別記号

庁内整理番号
7115—4B
7252—4C
6760—4B

④ 公開 昭和59年(1984)5月21日

発明の数 1
審査請求 未請求

(全 3 頁)

⑭ ハイブリッドプラスミド

② 特 願 昭57—197360

② 出 願 昭57(1982)11月10日

特許法第30条第1項適用 昭和57年8月25日
社団法人日本生化学会の「第55回日本生化学
会大会講演予稿集」において発表

② 発 明 者 水島昭二

名古屋市天白区天白町平針住宅
15番6号

① 出 願 人 水島昭二

名古屋市天白区天白町平針住宅
15番6号

④ 代 理 人 弁理士 長谷川一 外1名

明細書の浄書(内容に変更なし)
明 細 書

1 発明の名称 ハイブリッドプラスミド

2 特許請求の範囲

(1) 大腸菌多コピー数プラスミドの制限酵素

Bal I 切断サイトに、omp F 遺伝子を含み、
omp F 遺伝子より下流に Pvu II 切断サイトを
有する DNA フラグメントを挿入してなるこ
とを特徴とするハイブリッドプラスミド。

3 発明の詳細な説明

本発明はハイブリッドプラスミドに関し、さ
らに詳しくは雑種タンパクの発現に好適なハイ
ブリッドプラスミドに関する。

大腸菌の外膜を構成するタンパク質のひとつ
の omp F タンパク質は、大腸菌が最も多量に生
産するタンパク質のひとつである。その遺伝子
omp F のプロモーターヤリボゾム結合領域は
きわめて効率よく機能しているものと考えられ
る。omp F 遺伝子の発現は複雑な制御を受ける
が、そのひとつとして omp F 遺伝子発現の正の

制御遺伝子 omp B 遺伝子が知られており、omp
B 欠損変異株では omp F 遺伝子は発現しない。
また培地の浸透圧によつても制御を受け、高浸
透圧培地中では omp F 遺伝子の発現は抑制され
る。

omp F 遺伝子の全塩基配列は本発明者らによ
つて決定されたが、それによれば omp F タンパ
ク質はまずアミノ末端に 2 ユケのアミノ酸より
なるシグナル・ペプチドをつけた前駆体として
合成される。このシグナル・ペプチドは omp F
タンパク質の細胞質膜からの分泌に必須の役割
を担っているものと考えられる。さらに omp F
タンパク質は外膜中で細胞壁を構成するペプチ
ドグリカンと強い親和性をもつた非常に安定な
形で多量に存在しており、この性質を利用して
菌体から容易に精製することのできるタンパク
質でもある。

本発明は、上記のような性質を有する大腸菌
をはじめとするグラム陰性菌の外膜タンパク質
omp F 遺伝子に関する研究の一環として、この

omp F 遺伝子を含むプラスミドについて種々検討を行ない、その結果本発明に到達した。

すなわち、本発明の要旨は、大腸菌多コピー数プラスミドの制限酵素 Bal I 切断サイトに、omp F 遺伝子を含み、omp F 遺伝子より下流に Pvu II 切断サイトを有する DNA フラグメントを挿入してなることを特徴とするハイブリッドプラスミドにある。

以下、本発明を詳細に説明する。

まず、本発明において原料プラスミドとして用いられるのは、コピー数の多い、大腸菌由来のプラスミド、すなわちいわゆる大腸菌多コピー数プラスミドである。このようなプラスミドとしては、Bal I 切断サイトを有するものであれば特に制限されないが、たとえば pBRJ22、pBRJ25、pAOY0/84 等が挙げられるが、pBRJ22 が最も好ましい。

本発明のハイブリッドプラスミドは、この原料プラスミドの制限酵素 Bal I 切断サイトに、特定の DNA フラグメントを挿入してなる。こ

の DNA フラグメントは、omp F を含み、omp F 遺伝子より下流に Pvu II 切断サイトを有するものである。このような DNA フラグメントは、好適には、大腸菌 K-12 の omp F 形質導入 λ フラグメントである λomp F / (Journal of Bacteriology, 145, 1085-1090) より、制限酵素 Bal I により切断して単離することによつて得ることができる。

また、大腸菌 (omp F⁺) より全染色体 DNA をとり、Bal I で切断して、pBRJ22 の Bal I 切断サイトに導入し、宿主大腸菌 (omp B⁺, omp F⁻) に導入して形質転換して omp F⁺ のものを選択することによつても得ることができる。

本発明における上記 DNA フラグメントは、第1図に示されるように、omp F 遺伝子より上流に EcoR I 切断サイトを2箇所、下流に Hind III 及び Pvu II 切断サイトをそれぞれ1箇所、遺伝子中に Pvu II 切断サイトを1箇所有する。

原料プラスミドとして pBRJ22、DNA フラグメントとして λomp F / 由来のものを用いる

- 3 -

場合の製造の概略を第1図に示す。黒の太線 (■) は E. coli 染色体 DNA、白抜きの太線 (□) は λ フラグメント DNA を示す。 pBRJ22 は細線で示される。 omp F 遺伝子の位置は、■→で示される (■は開始点、▶は終止点)。 B, B, E, H 及び F は、それぞれ制限酵素 Bal I、Bam HI、EcoR I、Hind III 及び Pvu II 切断サイトを示す。また、Ap^r はアンピシリン耐性、Tc^r はテトラサイクリン耐性を示し、ori は複製起点を示す (λomp F / DNA においては、Bam HI 及び Bal I 切断サイトのみが示されている)。第1図に示されるように、λomp F / より単離された約 4 kb の Bal I DNA フラグメントは、pBRJ22 を Bal I で切断したものと混合され、T4 DNA リガーゼ処理される。目的とするハイブリッドプラスミド (pLF2、pLF3) は上記 DNA フラグメントが、pBRJ22 の Bal I 切断サイトにそれぞれ逆向きに挿入されたものである。

上記のように λomp F / 由来の DNA フラグメ

- 4 -

ントを用いる場合には、omp F 遺伝子より下流の末端は λ フラグメント DNA を介して λ フラグメント DNA の Bal I 切断サイトにより、pBRJ22 の Bal I 切断サイトに結合されることとなる。

pLF2、pLF3 のような本発明に係るハイブリッドプラスミドは、多コピー数プラスミドに全 omp F 遺伝子を含む DNA フラグメントを組み込んでおり、omp F 遺伝子のシグナル・ペプチド下流の翻訳領域には制限酵素 Bgl II 切断サイトを有する。したがって、この Bgl II 切断サイトに医薬的に有益なタンパク質遺伝子を挿入すると、omp F 遺伝子と目的タンパク質遺伝子との雑種遺伝子を合成し得る。こうして得られる雑種プラスミドを、形質転換によつて正常な omp B 遺伝子を持つ大腸菌 (たとえば、HB101、X1774 等) に導入すれば、目的タンパク質遺伝子は omp F 遺伝子の強力なプロモーターによつて効率よく転写され、多量に合成される Omp F タンパク質と目的タンパク質よりなる雑種タンパク質を、Omp F タンパク質のシグナル・ペ

ブチドによつて細胞質膜外に分泌することができ
る。

以下、実施例により本発明をさらに説明する。
実施例 1

大腸菌 (*E. coli*) K-12 の *ompF* 形質導入
λファージである λ *ompF* / DNA (*Journal of*
Bacteriology 145, 1085-1090) を用いて
ompF 遺伝子を含む DNA フラグメントの単離
を行なつた。λ *ompF* / の増殖は Schrenk と
Weisberg の方法 (*Molecular & General Genetics*,
137, 101-107) に従つた (L 培地、30℃)。
λ *ompF* / の DNA を常法に従いフェノール抽
出によつて得た後、エタノール沈殿によつて回
収した。

λ *ompF* / DNA を制限酵素 *Sal*I で完全切断
し、アガロースゲル電気泳動にかけた。 *ompF*
遺伝子を含む 14 kb のフラグメント部分を切り
出し、DNA フラグメントの溶出精製を行なつ
た。多コピー数プラスミドベクター pBR322 を
*Sal*I で完全切断し、λ *ompF* / より切り出し

た 14 kb *Sal*I フラグメントと混合し、Weiss
と Richardson の方法 (*Proc. Natl. Acad. Sci.* 57,
1021-1025) に従つて T4 DNA リガーゼ処
理を行なつた。この反応液を Dagert と Ehrlich
の方法 (*Gene*, 6, 23-28) に従つて大腸菌
(*ompB*⁻) に形質転換して、アンピシリン耐性
株を得た。得られた株よりのプラスミド DNA
を解析することによつて、λ *ompF* / 由来の約
14 kb の *Sal*I フラグメントが pBR322 の *Sal*
I 切断サイトにそれぞれ逆向きに挿入された 2
種のプラスミド pLF2 及び pLF3 を得た (第 1
図)。

4 図面の簡単な説明

第 1 図は本発明のハイブリッドプラスミドの
製造の概略を示す説明図である。

出 願 人 水 島 昭 二
代 理 人 弁 理 士 長 谷 川 一
氏 名 / 名

- 7 -

- 8 -

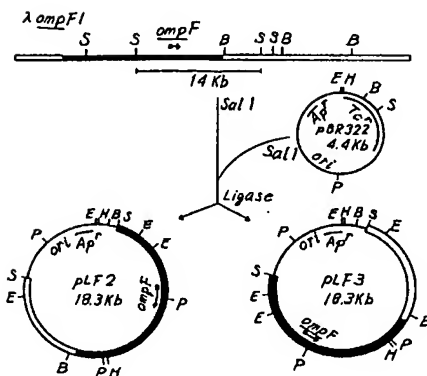
手続補正書 (方式)

昭和 58 年 3 月 10 日

特許庁長官・若 杉 和 夫 殿

図面の浄書(内容に変更なし)

第 1 図



1 事件の表示

昭和 57 年特許願第 197360 号

2 発明の名称

ハイブリッドプラスミド

3 補正をする者

事件との関係 出願人

水 島 昭 二

4 代 理 人 〒 100

東京都千代田区丸の内二丁目 5 番 2 号

三菱化成工業株式会社内

TEL. (283) 6976

(6806) 弁理士 長 谷 川 一

(ほか 1 名)

5 補正命令の日付 昭和 58 年 2 月 22 日 (発送日)

6 補正の対象 代理権を証明する書面および願書、明細書、図面

7 補正の内容

別紙の通り委任状を提出する。

願書、明細書および図面の浄書(内容に変更なし)。

